DOI：10.11931/guihaia.gxzw202312009

利用 CRISPR/Cas9 技术创制番茄青枯病抗性基因 *Slmlo*1/6 突变体

史建磊[1,2]，熊自立[1]，苏世闻[1]，付存念[1]，宰文珊[1*]

(1. 温州科技职业学院浙南作物育种重点实验室，浙江 温州 325006；

2. 福建农林大学 农学院，福州 350002)

摘　要：青枯病是番茄(*Solanum lycopersicum*)生产中的一种毁灭性土传病害，致病菌生理小种复杂、易变异，而 *MLO* 基因隐性突变 *mlo* 具有广谱抗性，前期研究表明 *Slmlo*1/6 可能参与番茄青枯病抗性反应。为进一步研究番茄 *Slmlo*1/6 青枯病抗性基因功能，该文利用 CRISPR/Cas9 技术创制 *Slmlo*1/6 基因突变材料，并进行表型鉴定。结果表明：（1）首先设计 *SlMLO*1/6 靶点序列 gRNA，并与 U6 启动子组装，再将含高效靶点的 U6-gRNA1/6 片段通过 *Bsa* I 酶切连入 CRISPR 载体 pBGK，构建形成双基因融合敲除载体 pBGK-*SlMLO*1/6。重组质粒经转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5α和平板培养，挑选阳性单克隆。验证正确后，再经农杆菌(*Agobacterium tumefaciens*) GV3101 介导的遗传转化和潮霉素抗性筛选，最终获得 9 株番茄编辑苗。（2） 靶点区测序显示，植株 M2 和 M8 分别缺失 177 bp 和 7 bp 的 *SlMLO*1 片段，M7 缺失 12 bp 的 *SlMLO*6 片段，M9 发生 *SlMLO*6 单碱基 T 插入，总计 4 株单基因纯合突变体，其他均为杂合型突变。（3）RT-qPCR 分析表明，与野生型相比，突变株 *SlMLO*1/6 基因表达水平显著下降，尤其是 M2、M7 和 M8。（4）表型鉴定表明，*SlMLO*1/6 可能是番茄青枯病易感基因。总之，该文成功构建了 *MLO* 基因编辑载体并实现了番茄转化，纯合突变体获得了青枯病抗性。氨基酸丢失和移码突变可能是 *Slmlo*1/6 抗性功能转变的主要原因。该研究结果为番茄抗青枯病基因功能研究和抗病育种应用提供了理论基础和遗传工程材料。

关键词：番茄，*Slmlo*1/6，基因编辑，遗传转化，突变体

Bacterial wilt resistance gene *Slmlo*1/6 mutants in tomato created by CRISPR/Cas9 technology

SHI Jianlei[1,2], XIONG Zili[1], SU Shiwen[1], FU Cunnian[1], ZAI Wenshan[1*]

(1. *Southern Zhejiang Key Laboratory of Crop Breeding*, *Wenzhou Vocational College of Science and Technology*, Wenzhou 325006, Zhejiang, China; 2. *College of Agriculture*, *Fujian Agriculture and Forestry University*, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Bacterial wilt is a devastating soil-borne disease in tomato (*Solanum lycopersicum*) production. The pathogenic species are complex and tend to have a variation, while *mlo* caused by the recessive mutation of *MLO* genes has a broad-spectrum resistance. The previous study suggested that *Slmlo*1/6 may be involved in the resistance response to bacterial wilt in tomato. In order to further study the gene function of *Slmlo*1/6 in tomato bacterial wilt resistance, the genetic mutant plants were created by CRISPR/Cas9 technology and their phenotypes were identified

---

基金项目：浙江省农业新品种选育重大科技专项子课题(2021C02065)；浙江省基础公益研究计划(LTGN23C020002)；温州市农业新品种选育协作组项目(2019ZX007)。

第一作者：史建磊(1982—)，博士，副教授，主要从事作物遗传育种与生物技术研究，(E-mail) sjlhebau@163.com。

[*]**通信作者**：宰文珊，硕士，研究员，研究方向为蔬菜遗传育种，(E-mail) 273493129@qq.com。

followed. The results were as follows: (1) First, gRNA sequences of *SlMLO*1/6 were designed and assembled with the U6 promoters, then U6-gRNA1/6 fragments containing highly effective targets were ligated to CRISPR vector of pBGK via restriction enzyme *Bsa* I digestion, to construct the two-gene fusion knockout vector of pBGK-*SlMLO*1/6. The recombinant plasmid of pBGK-*SlMLO*1/6 was transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells and positive monoclonal clones were selected via plate cultivation. Using *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strains-mediated genetic transformation and resistance screening to hygromycin, a total of 9 edited tomato plants were obtained with the PCR and sequencing validation. (2) Target region sequencing showed that M2 and M8 plants had the 177 bp and 7 bp deletion of *SlMLO*1, respectively, M7 had the 12 bp deletion of *SlMLO*6, and M9 had a single base T insertion of *SlMLO*6. Except for 4 single gene homozygous mutants above, the other mutations were heterozygous. (3) RT-qPCR showed that compared with the wild type plant, *SlMLO*1/6 gene expression of the mutants was significantly decreased, especially M2, M7, and M8 plants. (4) Phenotypic identification indicated that *SlMLO*1/6 may be tomato bacterial wilt susceptibility genes. In a word, the knockout vector is successfully constructed for broad-spectrum resistance *MLO* genes and tomato transformation is also achieved. Further, a few homozygous gene edited plants acquire resistance to bacterial wilt to some extent. Amino acid deletion and frameshift mutation may be two crucial reasons for the gene function change of *Slmlo*1/6 in resistance. The results provide a theoretical basis and genetic engineering materials for the gene function study in resistance to bacterial wilt and disease resistance breeding in tomato.

Key words: tomato, *Slmlo*1/6, gene editing, genetic transformation, mutant

作为植物基因功能研究和作物遗传改良的有力工具，规律成簇间隔短回文重复序列及其相关系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)是目前应用最广的一项基因编辑技术，主要由单导 RNA (Single guide RNA, sgRNA)和Cas9组成(Mali et al., 2013)。sgRNA通过识别目的基因前间区邻近基序(Protospacer aceradjacent motif, PAM)，引导 Cas9 对靶序列进行切割，产生双链断裂，修复过程中引起靶点突变，进而产生表型变异。

MLO (Mildew resistance locus O)是一类最早在大麦(*Hordeum vulgare*)中发现并克隆的白粉病易感基因(Buschges et al., 1997)，其隐性突变 *mlo* 对白粉菌几乎所有生理小种具有高效和持久抗性(Reinstädler et al., 2010)。此后相继在多种高等植物中发现其同源基因，突变同样具有白粉病抗性(Kusch & Panstruga, 2017)。利用基因编辑技术，多个 *mlo* 被证明是白粉病抗性基因，如番茄(*Solanum lycopersicum*) *Slmlo*1、辣椒(*Capsicum annuum*) *Camlo*1/2、茄子(*Solanum melongena*) *Smmlo*1、烟草(*Nicotiana tabacum*) *Ntmlo*1 和黄瓜(*Cucumis sativus*) *Csmlo*1 等(Zheng et al., 2013; Appiano et al., 2015; Nie et al., 2015; Bracuto et al., 2017)。除白粉病外，*mlo* 也参与假单胞菌、黄单胞菌、卵菌、尖孢镰刀菌、炭疽菌和稻瘟病菌等多种病原体引起的植物病害反应(Kim & Hwang, 2012; Kim et al., 2014; Acevedo-Garcia et al., 2017)。

番茄是全球范围内重要的蔬菜作物，也是一种理想的基因编辑作物，但生产中频繁遭受各种逆境胁迫。作为最重要的植物病原细菌之一，青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的青枯病对番茄危害尤为严重，因此建立快速高效的抗病品种选育方法势在必行。前期研究发现 *SlMLO*1/6 均含有 7 个跨膜结构域，定位于原生质膜，前者含一个钙调素结合区(Calmodulin binding domain, CaMBD) (Shi et al., 2020)。同时，*SlMLO*1 是已知的白粉病广谱抗性基因，*SlMLO*6 与辣椒感青枯病基因 *CaMLO*6 同源(Bai et al., 2008; Yang et al., 2020)。RT-qPCR 显示两者均能在转录水平上响应番茄青枯病害(Shi et al., 2020)。本研究以番茄青枯病抗性突变体创制为对象，依托植物广谱抗性因子 *mlo* 和番茄遗传转化体系，基于已有 *MLO* 生物信息学

和基因定量表达研究，采用CRISPR/Cas9基因编辑技术，通过构建*Slmlo*1/6基因敲除载体并转化番茄，拟探讨以下问题：（1）番茄中*MLO*的精准敲除和纯合突变体的创制；（2）靶点突变类型和突变前后目的基因的表达变化；（3）突变株的青枯病抗性表型。旨在为抗青枯病基因功能研究和品种改良提供理论基础和遗传工程材料。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

供试番茄(*S. lycopersicum*) Ailsa Craig (AC)，是分子功能研究的模式品种。CRISPR系统pBGK购自百格基因科技(江苏)有限公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α和根癌农杆菌(*Agobacterium tumefaciens*) GV3101为本实验室保存。

Trizol总RNA提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、荧光定量染料SYBR Premix Ex Taq等购自生工生物工程(上海)股份有限公司；PCR Master Mix、DNA Marker、T4 DNA连接酶(Ligase)、T4多聚核苷酸激酶(PNK)等购自宝生物工程(大连)有限公司；限制性核酸内切酶*Bsa* I和*Sph* I购自TaKaRa公司；卡那霉素和潮霉素购自鼎国生物公司。培养基组分等所需生化试剂均为国产分析纯。PCR引物由生工生物工程(上海)合成。

1.2 试验方法

1.2.1 靶点设计与载体构建

利用在线工具CRISPR-P2.0 (http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/)于目的基因第1和3外显子处设计2个CRISPR靶位点，选取高效靶点设计引物(表1)。将gRNA靶点序列复性形成Oligo二聚体后，连接至经*Bsa* I酶切的CRISPR载体pBGK。反应体系如下：gRNA-U6片段1 μL、Oligo二聚体0.3 μL、T4 ligase 0.3 μL和T4 PNK 0.1 μL 23 ℃反应1 h后，加T4 ligase 0.3 μL、ddH_2O 4 μL和pBGK 1 μL 23 ℃连接反应1 h。取5 μL上述反应液，加入20 μL大肠杆菌DH5α感受态细胞，混合后冰浴静置30 min；轻轻取出，42 ℃热激35 s，立即置于冰上2 min；加入100 μL LB，37 ℃振荡培养1 h；取60 μL菌液涂布于含50 $\mu g \cdot mL^{-1}$卡那霉素(Kan)的LB平板上，37 ℃倒置培养过夜。挑选阳性单克隆送样测序。测序引物SR：CTGCAGAATTGGCGCACGCGCTACG。

1.2.2 农杆菌介导的遗传转化

利用冻融法转入农杆菌GV3101，经鉴定正确的单菌落用叶盘法转化番茄AC (Jian et al., 2015)。主要操作如下：1/2 MS培养基播种番茄无菌种子，待子叶展开第一片真叶还未出现时，剪取子叶进行预培养，农杆菌侵染后共培养，转至潮霉素分化选择培养基，经3次继代培养后，将减去愈伤组织的芽转至生根培养基培养，待幼苗长至合适大小炼苗移栽。

1.2.3 转化株靶点扩增与测序

提取转化单株幼嫩叶片基因组DNA。根据目的基因序列设计引物(表1)，对靶点区进行PCR检测。将扩增目的条带进行纯化和测序，结合测序峰图及序列比对分析突变类型。PCR扩增体系：1 μL DNA，2 μL 10×PCR buffer，0.4 μL dNTP Mixture，正反向引物各0.2 μL，0.2 μL *Taq*酶，加ddH_2O补充至20 μL。扩增条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，30个循环；72 ℃延伸10 min。

1.2.4 目的基因RT-qPCR检测

取样4-6叶期番茄幼苗嫩叶，锡箔纸包裹置于液氮中，两次生物学重复。提取野生型和突变株RNA并反转录成cDNA。以*Slactin*和*SlRPL*2为内参基因，利用Primer Premier 5.0软件设计定量引物(表1)。RT-qPCR反应体系包括2 μL cDNA, 0.4 μL PCR primer, 10 μL SYBR, 7.2 μL ddH_2O。扩增程序为95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45个循环，整体反应在StepOne Plus型荧光定量PCR仪(ABI, USA)中进行，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。

表 1 所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物用途 Primer use	基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
载体构建 Vector construction	*SlMLO*1	TGATTGCACAGCAATTGCCCACGTAGTTT	TCTAAAACTACGTGGGCAATTGCTGTGCA
	*SlMLO*6	TGTAGTTTGCACCAACTTGGGCTGTGGC	AAACGCCACAGCCCAAGTTGGTGCAAAC
靶点测序 Target sequencing	*SlMLO*1	ATTTCCCCTTCTTCTTATTC	TACCAGCTTTGATCTTTTCA
	*SlMLO*6	AAAATTCCCTTTCACCACTA	TCTTCTTCCTAAACGCAAAA
RT-qPCR	*Slactin*	GAAATAGCATAAGATGGCAGACG	ATACCCACCATCACACCAGTAT
	*SlRPL*2	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA	CGTTACAAACAACAGCTCCTTC
	*SlMLO*1	CGAAAAAAACGGGTGAAACAT	GGATAACCGCGTAATAAGTGAA
	*SlMLO*6	GGGTGGCAAGCATTGTTCT	GGATTCCTTGAACTACTGCATGT

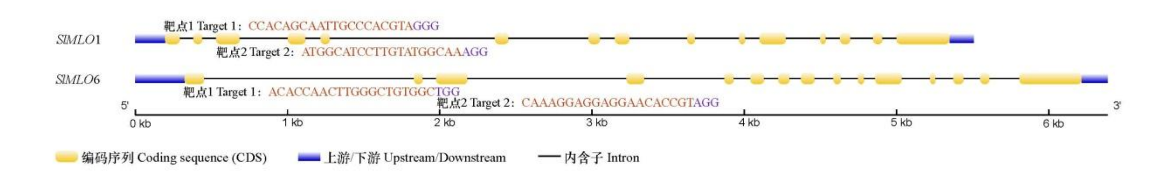
1.2.5 苗期青枯病接种鉴定

番茄幼苗长至 4~6 片真叶时，剪伤部分根系，用浓度 OD_{600}=1.0 的青枯菌液浸根 20 min，30 ℃条件下培养，第 3 天观察植株抗性表型。

2 结果与分析

2.1 融合载体的构建与转化

*SlMLO*1 靶点 1 序列：CCACAGCAATTGCCCACGTAGGG，靶点 2 序列：ATGGCATCCTTGTATGGCAAAGG；*SlMLO*6 靶点 1 序列：ACACCAACTTGGGCTGTGGCTGG，靶点 2 序列：CAAAGGAGGAGGAACACCGTAGG，靶点长 20 bp (图 1)。对应的脱靶位点数分别为 5/31 和 26/33，所以双基因均选用第 1 靶点。融合载体命名为 pBGK-*SlMLO*1/6，含 U6 启动子驱动表达的双基因靶点 gRNA 克隆盒、35S 启动子驱动表达的 Cas9 酶基因和潮霉素筛选标记基因(*HYG*) (图 2)。回收 *Sph* I 酶切后的产物，经 0.8%琼脂糖凝胶电泳得到 5 500 bp 和 10 000 bp 左右大小的两条带(图 3)，与重组质粒 15 386 bp 大小相符，测序与设计靶点相同，表明 2 个靶点 gRNA 元件插入载体。随后，融合载体经农杆菌介导的番茄遗传转化(图 4)和 PCR 测序(图 5)，最终获得 9 个编辑单株(M1-4, 6-10)。

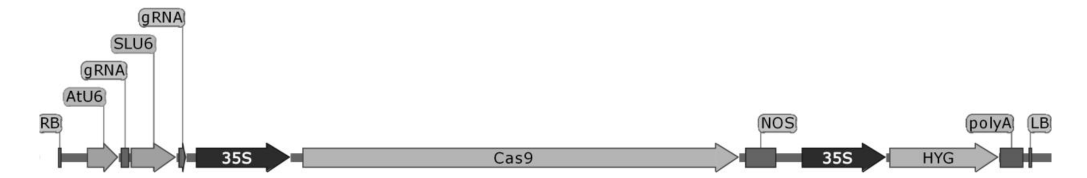


棕色和紫色字母分别表示靶点序列和 PAM 序列。

The brown and purple letters represent the target sequences and PAM sequences, respectively.

图 1 目的基因中的 2 个 gRNA 靶点

Fig. 1 Two gRNA loci in the target genes

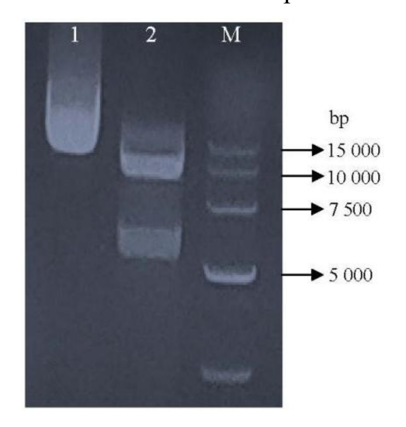


RB. T-DNA 右边界；**U6**. 小 RNA U6 启动子；**gRNA**. 向导 RNA；**35S**. 花椰菜花叶病毒 35S 启动子；**NOS**. 终止子；**HYG**. 潮霉素；**polyA**. 聚腺苷酸；**LB**. T-DNA 左边界。

RB. T-DNA right boundary; **U6**. Small RNA U6 promoter; **gRNA**. Guide RNA; **35S**. CaMV 35S promoter; **NOS**. Terminator; **HYG**. Hygromycin; **polyA**. Polyadenosinic acid; **LB**. T-DNA left boundary.

图 2 CRISPR 融合载体 pBGK-*SlMLO*1/6

Fig. 2 CRISPR fusion vector of pBGK-*SlMLO*1/6

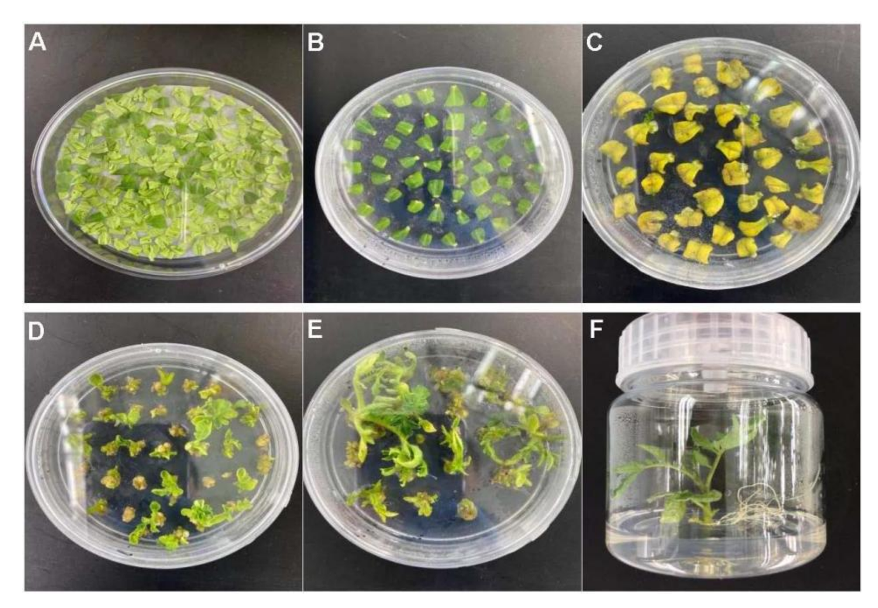


2. 用 *Sph* I 酶切后的质粒 pBGK-*SlMLO*1/6。

M. DL15 000 Marker (bp); **1**. pBGK-*SlMLO*1/6; **2**. pBGK-*SlMLO*1/6 digested with *Sph* I.

图 3 重组质粒 pBGK-*SlMLO*1/6 酶切电泳图

Fig. 3 Enzyme digestion electrophoresis of recombinant plasmid pBGK-*SlMLO*1/6



A. 子叶共培养 2 d；**B-E**. 筛选(芽分化)；**F**. 诱导生根 20 d。

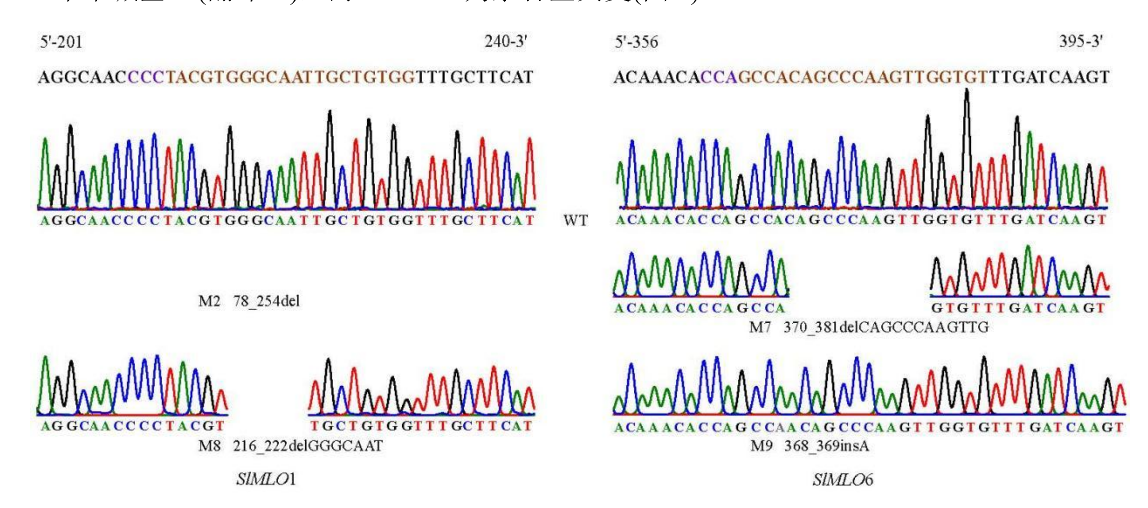
A. Cotyledon co-incubation 2 d; **B-E**. Bud induction; **F**. Rooting induction 20 d.

图 4 番茄的遗传转化

Fig. 4 Genetic transformation of the AC tomato

2.2 编辑株靶点序列突变型

测序结果表明，编辑植株 M1 为 *SlMLO*6 杂合突变体；M2 和 M8 分别缺失一个大小为 177 bp (包括起始密码子，翻译 MEATPTWAIAVVCFILLAIS)和 7 bp (GGGCAAT，翻译 WAI)的 *SlMLO*1 基因片段，而 *SlMLO*6 为杂合型突变；M3 和 M10 为 *SlMLO*1 杂合突变体；M4 和 M6 均为双基因杂合突变体；M7 缺失一个大小为 12 bp (CAACTTGGGCTG，翻译 PTWAV)的 *SlMLO*6 基因片段，而 *SlMLO*1 为杂合型突变；M9 基因 *SlMLO*6 位置 382-383 间插入了一个单碱基 T (翻译 V)，而 *SlMLO*1 为杂合型突变(图 5)。



突变用位置、类型(缺失或插入)和碱基的组合表示，WT 和 M 分别代表野生型和突变体。

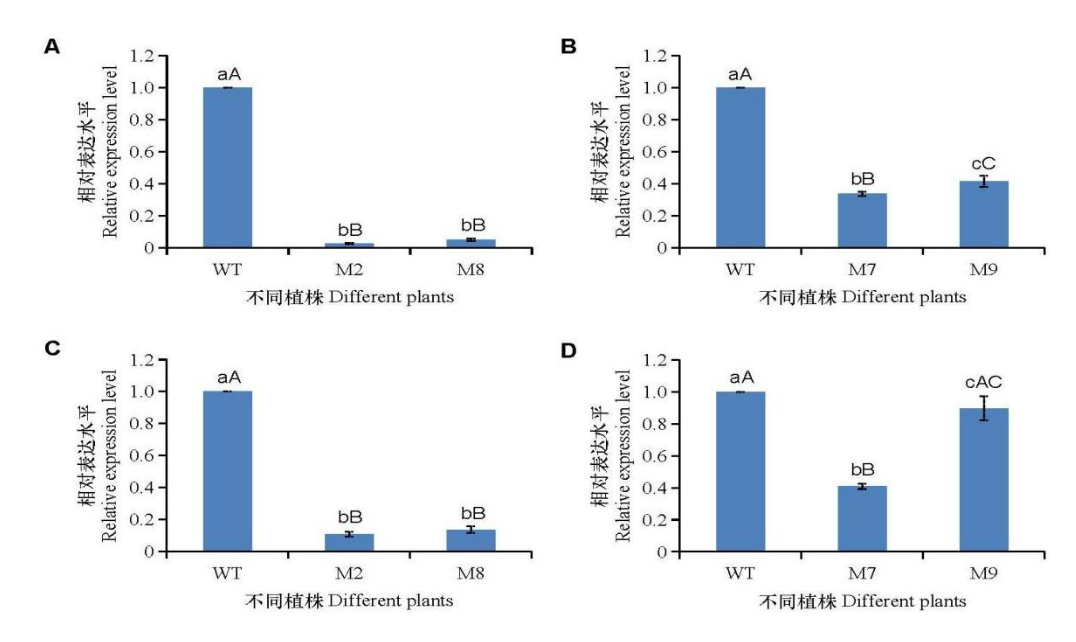
Mutations are represented as a combination of location, type (deletion or insertion), and bases, with WT and M representing wild-type and mutants, respectively.

图 5 纯合突变体靶点序列检测

Fig. 5 Target locus sequencing of homozygous mutants

2.3 目的基因定量表达分析

基因定量表达结果表明，两个内参下，与野生型(WT)相比，纯合突变株 M2 和 M8 *SlMLO*1 表达水平均极显著(P<0.01)下降，前者表达水平更低但两者差异不显著(图 6：A，C)。以 *Slactin* 为内参，纯合突变株 M7 和 M9 *SlMLO*6 表达水平均极显著(P<0.01)下降，前者表达水平更低且两者差异显著(图 6：B)；以 *SlRPL*2 为内参，M7 和 M9 *SlMLO*6 表达水平均比野生型低，但显著性水平不同，前者极显著(P<0.01)而后者显著(P<0.05) (图 6：D)。整体来看，*Slactin* 更适合用作内参基因，M2、M7 和 M8 突变效果更明显。



以 *Slactin* (AB)和 *SlRPL2* (CD)为内参基因，柱状上方的不同大、小写字母分别表示 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平上的差异显著性。

Slactin (AB) and *SlRPL2* (CD) were used as internal reference genes. Different uppercase and lowercase letters above columns indicate significant differences at $P<0.01$ and $P<0.05$ levels, respectively.

图 6 纯合突变株 *SlMLO1* (AC)和 *SlMLO6* (BD)基因的相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of *SlMLO1* (AC) and *SlMLO6* (BD) in homozygous mutants

2.4 编辑株青枯病抗性表型

基于基因测序和定量表达结果，对敲除效果明显的 3 个纯合单株 M2、M7 和 M8 进行青枯病抗性表型鉴定。发现接种青枯菌后，植株长势明显好于野生型(WT)番茄，观察期内基本未出现病症(图 7)，说明 *SlMLO1/6* 可能参与番茄青枯病负调控。



图 7 突变株 M2、M7 和 M8 的青枯病抗性表型

Fig. 7 Bacterial wilt resistance phenotypes of M2, M7, and M8 mutants

3 讨论与结论

青枯菌具有广泛的环境和生态适应性。目前，利用正向遗传学仅在拟南芥中克隆到一个抗青枯病基因 *RRS1* (Deslandes et al., 1998)，相关基因鉴定、功能研究及生产应用还非常有限。因此，广谱抗性挖掘和感病基因失活成为研究热点。与其他基因功能研究技术相比，基因编辑具有克隆策略相对简单、可多靶点敲除、脱靶率较低、适用范围广等优点(Ma et al., 2015)。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术定向敲除不利基因，能实现目标性状的遗传改良。并且，通过后代遗传分离可以获得不含载体元件的突变株系。*mlo* 代表了一类由寄主基因突变控制的广谱抗性新机制，能够参与多种生物和非生物胁迫响应(Nguyen et al., 2016)。基于

此，该研究利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 *Slmlo*1/6 基因编辑载体，经转化番茄和测序鉴定，获得 9 株突变体，约 50%为纯合突变株。

*Slmlo*1/6 突变体不同位点编辑效果和类型不同，纯合突变包括片段缺失和单碱基插入，说明二倍体植物基因编辑多产生简单突变(Ma et al., 2015)。M2 和 M8 *SlMLO*1 编码蛋白分别丢失了 20 个和 3 个氨基酸且发生移码突变；M7 *SlMLO*6 丢失了 5 个氨基酸但新增了一个亮氨酸，下游序列不变；M9 *SlMLO*6 密码子 GTG 突变为 GTT，两者均翻译缬氨酸，但后续氨基酸移码突变，推测基因功能转变主要源自氨基酸丢失和移码突变。有研究表明，多个活性 U6 启动子可驱动多个 sgRNA，造成染色体大片段缺失。同时，稳定转化植株中以碱基缺失和插入为主，可能是 sgRNA 和 Cas9 可持续表达，靶点产生的碱基替换被继续编辑(Pu et al., 2018)。非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)修复过程中容易发生错误，使 DNA 断裂位置产生小片段缺失或插入；而同源重组(Homology-directed repair, HDR)可实现基因的定点修复或插入(Hsu et al., 2014)。本研究双基因靶点编辑支持上述稳定转化突变结论，且可能以 NHEJ 修复为主。定量分析表明，纯合突变体靶基因表达水平下降，并且 *SlMLO*1 较 *SlMLO*6 效果更明显，而杂合株需分离纯化。M1 *SlMLO*1、M3 和 M10 *SlMLO*6 未发生突变，可能与脱靶效应有关。

MLO 借助乳突作用负调控植物抗性及叶肉细胞死亡，通过协助病原菌侵染，抑制防御反应(Kim et al., 2002a)。同时，*MLO* 可通过结合钙调素(calmodulin, CaM)提高自身功能活性以降低植物抗病力(Kim et al., 2002b)。前期研究表明 *SlMLO*1 含有 CaMBD，推测其通过结合 CaM 促进番茄感病。辣椒 *CaMLO*6 通过与 *CaWRKY*40 互作负调控青枯病抗性(Yang et al., 2020)。鉴于番茄和辣椒的亲缘关系，推测 *SlMLO*6 具有相似功能。抗性表型初步鉴定说明 *SlMLO*1/6 可能是青枯病易感基因。但是，青枯病抗性遗传复杂，受多基因控制。由于脱靶效应的存在，非目的基因(编码区和非编码区)打靶如何影响编辑效果和植株表型，需进一步通过全基因组或脱靶位点测序进行评估。同时，*MLO* 家族基因是否存在功能冗余和多等位基因效应，也需进一步验证。总之，需从表型、理化和分子水平对不同品种番茄 *Slmlo*1/6 突变体及其后代进行综合鉴定，以获得纯合稳定有生产应用价值的育种材料。

参考文献：

ACEVEDO-GARCIA J, GRUNER K, REINSTÄDLER A, et al., 2017. The powdery mildew-resistant Arabidopsis *mlo*2 *mlo*6 *mlo*12 triple mutant displays altered infection phenotypes with diverse types of phytopathogens [J]. Sci Rep, 7: 9319.

APPIANO M, PAVAN S, CATALANO D, et al., 2015. Identification of candidate *MLO* powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco *NtMLO*1 [J]. Transgen Res, 24(5): 847-858.

BAI Y, PAVAN S, ZHENG Z, et al., 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of *mlo* function [J]. Mol Plant Microbe In, 21(1): 30-39.

BRACUTO V, APPIANO M, RICCIARDI L, et al., 2017. Functional characterization of the powdery mildew susceptibility gene *SmMLO*1 in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Transgen Res, 26(3): 323-330.

BUSCHGES R, HOLLRICHER K, PANSTRUGA R, et al., 1997. The barley *MLO* gene: a novel control element of plant pathogen resistance [J]. Cell, 88(5): 695-705.

Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, et al., 1998. Genetic characterization of *RRS*1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. Mol Plant Microbe In, 11(7): 659-667.

HSU PD, LANDER ES, ZHANG F, 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for

genome engineering [J]. Cell, 157(6): 1262-1278.
JIAN X, MIAO YM, SUI YH, et al., 2015. Cloning and expression vector construction of cucumber LDC and transformation to tabacco [J]. Guihaia, 35(2): 255-260. [简兴，苗永美，隋益虎，等，2015．黄瓜 LDC 克隆、表达载体的构建及烟草转化研究［J］．广西植物，35(2)：255-260.]
KIM DS, CHOI H W, HWANG BK, 2014. Pepper mildew resistance locus O interacts with pepper calmodulin and suppresses *Xanthomonas* AvrBsT-triggered cell death and defense responses [J]. Planta, 240: 827-839.
KIM DS, HWANG BK, 2012. The pepper *MLO* gene, *CaMLO*2, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation [J]. Plant J, 72, 843-855.
KIM MC, LEE SH, KIM JK, et al., 2002a. Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. Isolation and characterization of a rice *Mlo* homologue [J]. J Biol Chem, 277(22): 19304-19314.
KIM MC, PANSTRUGA R, ELLIOTT C, et al., 2002b. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley [J]. Nature, 416(6879): 447-451.
KUSCH S, PANSTRUGA R. 2017. *mlo*-based resistance: an apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease [J]. Mol Plant Microbe Interact, 30(3): 179-189.
MA X, ZHANG Q, ZHU Q, et al., 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. Mol Plant, 8(8): 1274-1284.
MALI P, ESVELT KM, CHURCH GM, 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. Nat Methods, 10(10): 957-963.
NGUYEN VNT, VO KTX, PARK H, et al., 2016. A systematic view of the *MLO* family in rice suggests their novel roles in morphological development, diurnal responses, the light-signaling pathway, and various stress responses [J]. Front Plant Sci, 7: 1413.
NIE J, WANG Y, HE H, et al., 2015. Loss-of-function mutations in *CsMLO*1 confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Front Plant Sci, 6: 1155.
PU Y, LIU C, LI JY, et al., 2018. Different *SlU*6 promoters cloning and establishment of CRISPR/Cas9 mediated gene editing system in tomato [J]. Sci Agric Sin, 51(2): 315-326. [蒲艳，刘超，李继洋，等，2018．番茄 U6 启动子的克隆及 CRISPR/Cas9 基因编辑体系的建立［J］．中国农业科学，51(2)：315-326．]
REINSTÄDLER A, MÜLLER J, CZEMBOR JH, et al., 2010. Novel induced *mlo* mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein [J]. BMC Plant Biol, 10(1): 31.
SHI J L, WAN H J, ZAI W S, et al., 2020. Phylogenetic relationship of plant *MLO* genes and transcriptional response of *MLO* genes to *Ralstonia solanacearum* in tomato [J]. Genes, 11(5): 487.
YANG S, SHI Y, ZOU L, et al., 2020. Pepper *CaMLO*6 negatively regulates *Ralstonia solanacearum* resistance and positively regulates high temperature and high humidity responses [J]. Plant Cell Physiol, 61(7): 1223-1238.
ZHENG Z, NONOMURA T, APPIANO M, et al., 2013. Loss of function in *Mlo* orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica* [J]. PLoS ONE, 8(7): e70723.